Vestnik zoologii, **41**(6): 535—541, 2007

Методика

УДК 593.175: 591.132: 627.88

НОВЫЙ ПОКАЗАТЕЛЬ ИНТЕНСИВНОСТИ ПИТАНИЯ ПЕРИТРИХ (CILIOPHORA, PERITRICHIA) В УСЛОВИЯХ ОЧИСТНЫХ СООРУЖЕНИЙ

Л. А. Константиненко[1], И. В. Довгаль[2]

[1]*Житомирский государственный университет им. И. Франко, ул. Пушкинская, 42, Житомир, 10002 Украина E-mail: lkonstantynenko1@rambler.ru*

[2] *Институт зоологии им. И. И. Шмальгаузена НАН Украины, ул. Б. Хмельницкого, 15, Киев, 01601 Украина E-mail: dovgal@izan.kiev.ua*

Принято 11 июля 2007

Новый показатель интенсивности питания перитрих (Ciliophora, Peritrichia) в условиях очистных сооружений. Константиненко Л. А., Довгаль И. В. — Приведены результаты апробации метода оценки интенсивности питания кругоресничных инфузорий с помощью вычисления квадрата числа пищевых вакуолей. Этот показатель определен для наиболее часто встречающихся в очистных сооружениях видов перитрих: *Vorticella striata, Epistylis plicatilis, E. bimarginata, Opercularia articulata* и *V. convallaria.* Установлен температурный оптимум, при котором данные виды питаются наиболее интенсивно (20—25°C). Метод рекомендуется использовать для контроля эффективности работы очистных сооружений, а также в биотестировании.

Ключевые слова: пищевые вакуоли, питание, перитрихи, очистные сооружения.

A New Index for Estimation of Nutrition Rate in Peritrichous Ciliates (Ciliophora, Peritrichia) under Conditions of the Treatment Facilities. Konstantynenko L. A., Dovgal I. V. — The article deals with approbation of the method of peritrichous ciliates nutrition rate evaluation using the square number of food vacuoles index. The indexes were judged for: *Vorticella striata, Epistylis plicatilis, E. bimarginata, Opercularia articulata* and *V. convallaria* the commonest peritrichous species in treatment facilities. The temperature optimum (20—25°C) wherein the nutrition rates of these ciliate species were the highest are established. The method is recommended for control of sewage disposal plants operating efficiency as well as in bioassay.

Key words: food vacuoles, nutrition, peritrichs, treatment facilities.

Введение

Кругоресничные инфузории — перитрихи являются одним из важнейших компонентов водных экосистем. В результате жизнедеятельности кругоресничных инфузорий совместно с другими животными, растительными организмами и бактериями происходит минерализация постоянно поступающих в водоемы органических веществ, что обеспечивает биологическое самоочищение воды (Банина, 1983).

Весьма велика роль перитрих в очистных сооружениях. В аэротэнках очистных сооружений кругоресничные инфузории являются одной из наиболее многочисленных групп организмов, они образуют скопления с высокой плотностью. Перитрихи являются активными седиментаторами, они питаются бактериями, но, не обладая способностью к выбору пищи, осаждают как пищевые, так и непищевые частицы, так что последние часто отмечаются в их пищевых вакуолях (Бурковский, 1984). Таким образом, перитрихи способствуют уменьшению мутности воды и снижают численность бактерий более интенсивно, чем другие группы цилиат (Истомина и др., 1973).

Кроме того, перитрихи являются индикаторами качества работы очистных сооружений (Банина, 1983; Жмур, 1997). Удобству использования кругоресничных инфузорий в таких целях способствует то, что это в основном прикрепленные формы. Показателем качества очистки является состояние перистома этих цилиат. Работа очистных сооружений считается неудовлетворительной,

если у обитающих в них перитрих перистом втянут или полузакрыт. Согласно нашим наблюдениям, указанные выше изменения, когда перитрихи фактически прекращают питаться, имеют место только при аварийных ситуациях в аэротенках, т. е. при остановке процесса очистки. Следовательно, такой метод не позволяет оценить качество работы очистных сооружений, а также выбрать оптимальные режимы их работы в обычных, неаварийных ситуациях. Для решения данной задачи необходим более точный метод оценки интенсивности питания перитрих, чем визуальное наблюдение состояния перистома.

Интенсивность питания простейших, в том числе инфузорий, наиболее точно определяют по количеству пищевых или непищевых объектов, поглощенных клетками за единицу времени. Среди таких методов есть прямые, например, учет изменения плотности бактерий в культуре с инфузориями-седиментаторами за определенный промежуток времени (Бурковский, 1984). При этом применяют флуоресцентную микроскопию или радиоизотопные метки (^{3}H, ^{14}C, ^{16}N) (Sher, Sher, 1992). Также учитывают количество контрастных непищевых частиц (корунд или различные красители), которые накапливаются в пищевых вакуолях за единицу времени (Раилкин, 1981, 1982). Однако это лабораторные методы, которые требуют специального оборудования. Экологические исследования требуют оценки интенсивности питания одноклеточных организмов в природных, а не лабораторных условиях.

Для решения этой проблемы были разработаны различные фагоцитарные индексы, с помощью которых интенсивность питания определяют расчетным способом по объему клетки (Павловская, 1971; Хлебович, 1979, 1986; Раилкин, 1982; Бурковский, 1984). Однако такой подход основан на экстраполяции результатов лабораторных исследований на природные объекты и дает слишком приближенные результаты.

В качестве альтернативы расчетному методу интенсивность фагоцитоза выражали средним числом пищевых вакуолей, образованных одноклеточными организмами за определенный промежуток времени (Hoffman et al., 1974). Однако А. И. Раилкин (1982) показал, что точной количественной характеристикой интенсивности фагоцитоза инфузорий является квадрат числа пищевых вакуолей, а не их число.

Следует отметить, что нам неизвестны последующие исследования, где этот показатель использовали для оценки интенсивности питания простейших. Неизвестно, насколько он применим в реальных, а не лабораторных условиях. В связи с этим целью настоящей работы является оценить возможность использования показателя А. И. Раилкина в отношении кругоресничных инфузорий и модифицировать данный метод с учетом особенностей биологии перитрих и условий аэротенков очистных сооружений.

Материал и методы

В целях устранения некоторых методических сложностей при проведении экспериментов нами был сделан ряд допущений. В частности, известно, что на интенсивность фагоцитоза инфузорий оказывает влияние концентрация пищевых частиц (Раилкин, 1981). Однако с учетом условий аэротенка, когда основу биомассы активного ила составляют бактерии, принималось, что исследования проводятся при избытке пищи для инфузорий. С учетом этого же обстоятельства, а также в связи с тем, что целью настоящего исследования не был прямой учет количества фагоцитированных частиц или их количества в отдельных вакуолях, инфузорий не помещали в стерильную среду и предварительно не выдерживали без доступа пищи (как это делали предыдущие исследователи).

Поскольку в условиях аэротенка инфузории-седиментаторы поглощают пищевые частицы, диапазон размеров которых относительно стабилен, нами не принимался во внимание диаметр пищевых вакуолей, который зависит от размеров пищевых частиц (Раилкин, 1981).

Материал (активный ил) отбирали в сооружениях по очистке бытовых и промышленных сточных вод г. Житомира (I секция I комплекса на конечной стадии биологической очистки).

Свежеотобранный активный ил, в котором содержались инфузории, выдерживали при температуре 10, 15, 20, 25 и 30°C в течение 2 часов в стеклянной посуде, после чего разливали его в чашки Петри (диаметр 3,5 см) по 2,5 мл. Поочередно в чашки с илом добавляли по 0,01 мл жидкой черной туши «Гамма» (Москва, Россия) и через 10 мин экспозиции подсчитывали количество пищевых вакуолей, содержащих частички туши. Продолжительность экспозиции была такой же, как в экспериментах А. И. Раилкина (1981, 1982).

Необходимо было также проверить, отражается ли на темпе питания перитрих их содержание в лабораторных условиях на протяжении определенного времени. Для этого были проведены контрольные эксперименты с пробами ила непосредственно после отбора материала из аэротенка при температуре 25°C.

В качестве модельных объектов использовали пять наиболее часто встречающихся в активном иле аэротенков видов перитрих: *Vorticella striata* Dujardin, 1841; *Epistylis plicatilis* Ehrenberg, 1831; *E. bimarginata* Nenninger, 1948; *Opercularia articulata* Goldfuss, 1820. *V. convallaria* (Linnaeus, 1758). Всего было исследовано 236 особей кругоресничных инфузорий. Для *V. convallaria* определяли только выборочные параметры, так как малый объем выборки для этого вида (12 ос.) не позволял

сформировать дисперсионный комплекс. Для колониальных видов перитрих в состав выборок могли быть включены несколько зооидов одной колонии.

Размеры клеток инфузорий определяли с помощью окуляр-микрометра при увеличениях 150—600 раз на микроскопе МБР—3. Объем клеток инфузорий для установления их индивидуальной массы определяли, используя алгоритмы Ю. В. Брянцевой и А. В. Курилова (2003).

В целях сравнения разных методов, также вычисляли рацион инфузорий по уравнению (Павловская, 1971; Хлебович, 1979, 1986 Бурковский, 1984):

$$I = 0,648 \cdot W^{0,8},$$

где I — максимальный суточный рацион особи, мг; W — индивидуальная масса особи, мг.

Для того, чтобы учесть влияние температуры воды на интесивность питания, использовали температурную поправку, вычисленную для инфузорий на основании кривой Крога (Хайдар Муна, 1992; Курилов, 2001, 2005):

$$Q_t = 34,28\ T^{-1,16},$$

где Q_t — поправочный коэффициент, T — температура воды в момент отбора проб.

Результаты и обсуждение

Достоверной разницы между средними КЧВ (по t-критерию) исследуемых видов перитрих при обработке проб непосредственно после отбора из аэротенков и после двухчасового содержания в лаборатории (температура активного ила в обоих случаях составляла 25°C) не было обнаружено. Это позволило обрабатывать материал не сразу после отбора, а через некоторое время.

Показатели интенсивности питания и данные по индивидуальной массе клеток инфузорий приведены в таблице 1. Наименьшая средняя масса клетки, по нашим данным, у *V. striata* ($0,1 \cdot 10^{-4}$ мг), наибольшая — у *O. articulata* ($1,29 \cdot 10^{-4}$ мг). Однако, если у *V. striata* за 10 мин формировалось минимальное число пищевых вакуолей, то максимальное среднее значение КЧВ было отмечено у *E. plicatilis*, а не у *O. articulata* — вида с наиболее крупными зооидами. При этом среднесуточный рацион оказался максимальным у самого крупного вида ($0,79 \cdot 10^{-4}$ мг для *O. articulata*), но это объясняется тем, что этот расчетный показатель является функцией объема. Соответственно фагоцитарный индекс не отражает особенностей питания отдельных видов инфузорий. В связи с этим в дальнейшем в качестве сравниваемого с КЧВ показателя, мы в основном анализировали объем клеток, а не рацион.

Вероятно, существует зависимость между размерами клеточного тела и числом пищевых вакуолей. У двух из изученных видов перитрих наблюдается достоверная положительная корреляция между объемом клетки и КЧВ, однако значения R незначительны. У *O. articulata* коэффициент корреляции между указанными показателями составлял 0,34, а у *V. striata* – 0,38. Когда данные по всем пяти видам перитрих были обработаны как единый массив, коэффициент корреляции составил 0,30, несмотря на существенные различия в размерах клеток разных видов.

Интересно, что у колониальных форм (*E. plicatilis, E. bimarginata*, *O. articulata*) скорость формирования пищевых вакуолей, т. е. интенсивность питания

Таблица 1. Индивидуальные массы клеток и показатели интенсивности питания перитрих из очистных сооружений

Table 1. The individual cell masses and characteristics of the feeding activity in peritrichous ciliates from sewage disposal plants

Вид	Объем выборки (N)	Индивидуальная масса клетки, мг·10^{-4}	КЧВ	Суточный рацион, мг 10^{-4}
Epistylis plicatilis	41	0,61 ± 0,08	134,05 ± 21,40	0,42 ± 0,04
E. bimarginata	63	0,44 ± 0,02	51,52 ± 8,15	0,33 ± 0,01
Opercularia articulata	78	1,29 ± 0,04	98,3 ± 11,58	0,79 ± 0,02
Vorticella convallaria	12	0,20 ± 0,03	36,08 ± 8,74	0,18 ± 0,02
V. striata	42	0,10 ± 0,01	3,62 ± 0,37	0,10 ± 0,01

отдельных зооидов оказалась выше, чем у одиночных (*V. striata, V. convallaria*) при одинаковой температуре. По-видимому, этому способствует совместная работа перистомов всех зооидов колонии, увеличивающая эффективность седиментации.

Для оценки применимости показателя КЧВ в отношении перитрих необходимо было установить, как меняется этот показатель при изменении факторов среды. Известно (Бурковский, 1984), что для инфузорий одним из основных факторов, влияющих на скорость потребления пищи, является температура воды. Установлены температурные оптимумы для ряда видов, при которых наблюдается наибольшая скорость питания. Так для *Paramecium caudatum* Ehrenberg, 1833 оптимальной была температура 25—30°C (Бурковский, 1984), тогда как для перитрих *V. convallaria* и *Carchesium polypinum* (Linnaeus 1758) она составила 30°C (Шубернецкий, Кривенцова, 1976).

Влияние температуры на интенсивность питания перитрих мы определяли с помощью однофакторного дисперсионного анализа. Для всех видов отмечена достоверная связь между температурой и КЧВ (рис. 1—4). Для *E. bimarginata* критерий Фишера (F) составил 12,3 при p = 0,000001, для *E. plicatilis* F = 19,2 при p = 0,000001, для *O. articulata* F = 9,36 при p = 0,000001 и для *V. striata* F = 2,7 при p = 0,04.

Следует отметить, что для всех изученных видов наблюдалось увеличение темпа питания с повышением температуры (рис. 1—4), хотя при 30°C значения КЧВ несколько снижались. На основании наших данных можно предположить, что оптимальной температурой для наиболее массовых видов, обитающих в аэротенках, является 20—25°C.

В то же время зависимость объема клеточного тела от температуры не было подтверждена статистически (рис. 1—4). Для *E. bimarginata* F = 0,96 при p = 0,43, для *E. plicatilis* F = 1,83 при p = 0,15, для *O. articulata* F = 0,74 при p = 0,57 и для *V. striata* F = 0,29 при p = 0,88.

Влияние температуры на размер суточного рациона, полученного расчетным методом для *E. bimarginata*, также не было подтверждено с помощью дисперсионного анализа (рис. 5, А). Значение критерия Фишера составило 0,93 при p = 0,45. При этом полученная картина была очень близка к зависимости объема клетки от температуры для этого вида (рис. 1, Б).

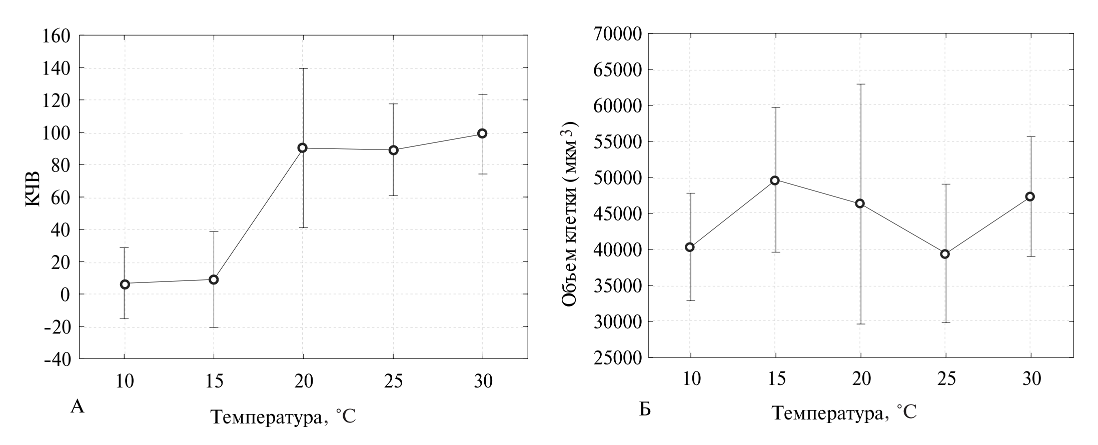


Рис. 1. Зависимость квадрата числа пищевых вакуолей (А) и объема клетки (Б) у *Epistylis bimarginata* от температуры. Результаты однофакторного дисперсионного анализа.

Fig. 1. The square number of food vacuoles (A) and cell volume (Б) dependence on temperature in *Epistylis bimarginata*, one-way ANOVA results.

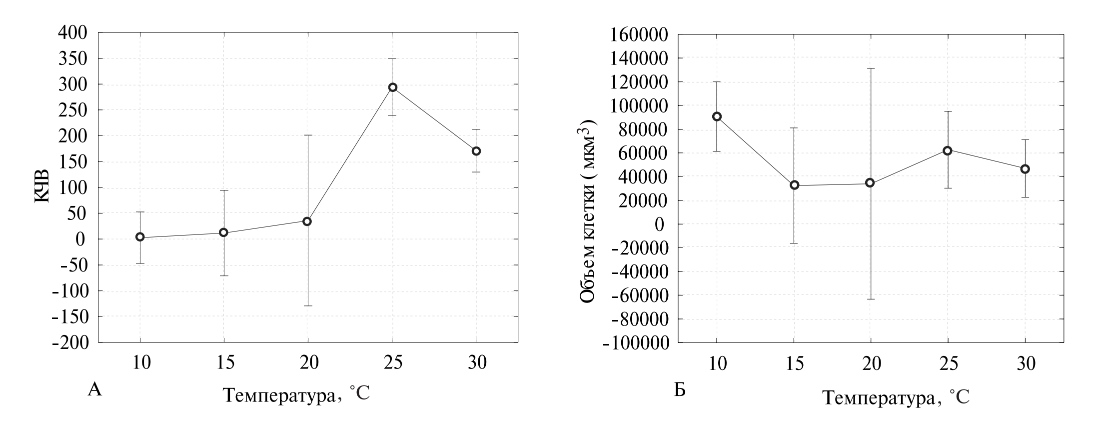


Рис. 2. Зависимость квадрата числа пищевых вакуолей (А) и объема клетки (Б) у *Epistylis plicatilis* от температуры. Результаты однофакторного дисперсионного анализа.

Fig. 2. The square number of food vacuoles (A) and cell volume (Б) dependence on temperature in *Epistylis plicatilis*, one-way ANOVA results.

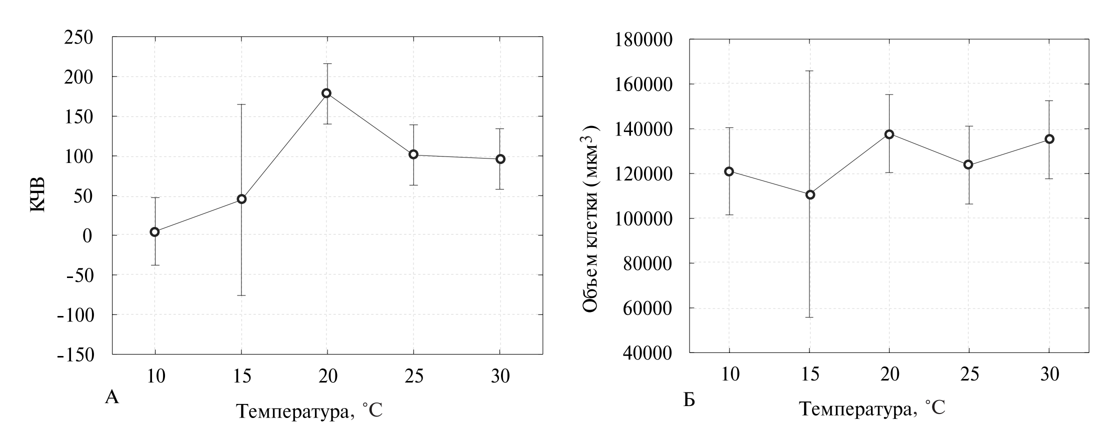


Рис. 3. Зависимость квадрата числа пищевых вакуолей (А) и объема клетки (Б) у *Opercularia articulata* от температуры. Результаты однофакторного дисперсионного анализа.

Fig. 3. The square number of food vacuoles (A) and cell volume (Б) dependence on temperature in *Opercularia articulata*, one-way ANOVA results.

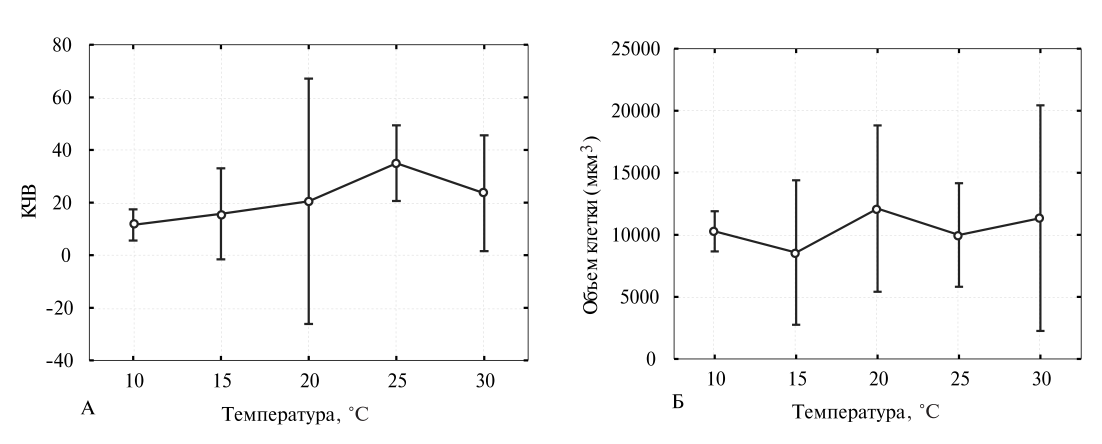


Рис. 4. Зависимость квадрата числа пищевых вакуолей (А) и объема клетки (Б) у *Vorticella striata* от температуры. Результаты однофакторного дисперсионного анализа.

Fig. 4. The square number of food vacuoles (A) and cell volume (Б) dependence on temperature in *Vorticella striata*, one-way ANOVA results.

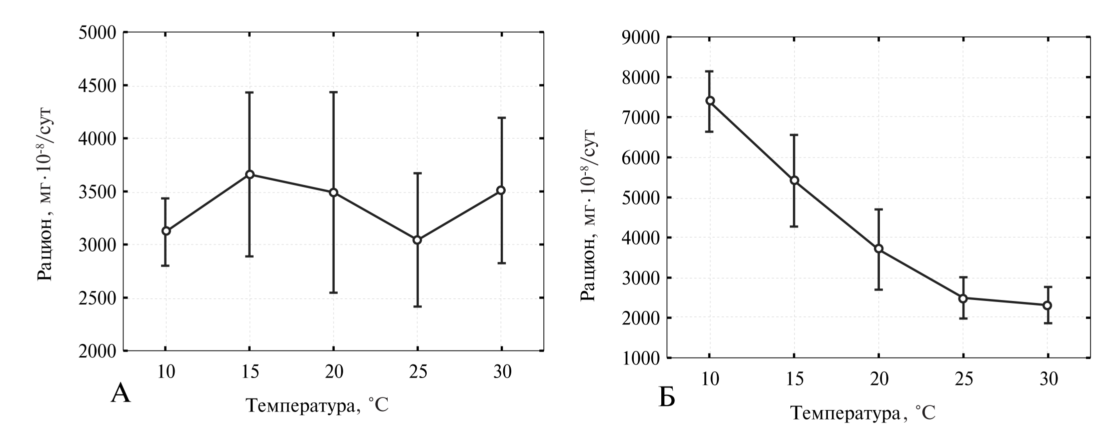


Рис. 5. Зависимость суточного рациона *Epistylis bimarginata* от температуры (А — без поправочного коэффициента, Б — с поправочным коэффициентом). Результаты однофакторного дисперсионного анализа.

Fig. 5. The daily ration dependence on temperature in *Epistylis bimarginata* (A — without correction factor, Б — with correction factor), one-way ANOVA results.

Однако влияние температуры на рацион было подтверждено статистически с высокой степенью достоверности при использовании температурного коэффициента ($F = 4{,}77$, $p = 0{,}0000001$). При этом (рис. 5, Б) наблюдается отрицательная зависимость между рационом и температурой, тогда как между КЧВ и температурой зависимость положительная (рис. 1, А). Это, на наш взгляд, объясняется тем, что величина Q_t, согласно расчетной формуле, уменьшается пропорционально температуре. Т. е., на самом деле, на рисунке 5, Б показана корреляция не между суточным рационом и температурой, а между поправочным коэффициентом и температурой.

Естественно, что инфузории не могут достаточно оперативно реагировать изменением размеров тела на факторы внешней среды. Это затрудняет использование расчетного метода, особенно при оценке интенсивности питания отдельных видов инфузорий, а не их таксоцена в целом. Что касается иных, помимо температуры, факторов среды, для которых не разработаны поправочные коэффициенты, то их влияние таким способом вообще не может быть надежно зарегистрировано.

В то же время разные виды перитрих формируют при одинаковой температуре разное число пищевых вакуолей. Вычисление квадрата этого показателя позволяет получить видовые характеристики интенсивности питания, и, следовательно, физиологического состояния инфузорий под влиянием не только температуры, но и других факторов, при условии определения их значений в данный момент времени.

Это позволяет рекомендовать показатель КЧВ перитрих в качестве регистрируемого параметра для контроля работы очистных сооружений, определения для них оптимальных технологических режимов, а также в биотестировании. Можно рекомендовать использовать в качестве тест-объектов колониальные виды перитрих, так как это облегчает получение выборок необходимого объема.

Банина Н. Н. Peritricha Sessilida в биоценозе активного ила // Протозоология : Простейшие активного ила. — Л. : Наука, 1983. — Вып. 8. — С. 87—116.

Брянцева Ю. В., Курилов А. В. Расчет объемов клеток микроводорослей и планктонных инфузорий Черного моря. — Препр. — Севастополь : ИнБЮМ, 2003. — 20 с.

Бурковский И. В. Экология свободноживущих инфузорий. — М. : Изд-во Моск. ун-та, 1984. — 208 с.

Жмур Н. С. Управление процессом и контроль результата очистки сточных вод на сооружениях с аэротенками. — М. : Луч, 1997. — 172 с.

Истомина Л. П., Кириченко А. Г., Ракитин Е. Г. О видовом составе простейших и водорослей активного ила сточной воды, очищенной в аэротенках // Гидробиол. журн. — 1973. — № 5. — С. 43—48.

Курилов А. В. Сезонная изменчивость сфуктурно-функциональных характеристик сообщества планктоных инфузорий Одеского залива // Экология моря. — 2001. — **58**. — С. 18—21.

Курилов А. В. Инфузории планктона прибрежной зоны и лиманов северо-западной части Черного моря : Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Севастополь, 2005. — 23 с.

Павловская Т. В. Питание и размножение массовых видов инфузорий : Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Севастополь, 1971. — 20 с.

Раилкин А. И. Количественный анализ фагоцитоза Paramecium caudatum Ehrbg. и Spirostomum ambiguum Ehrbg. // Acta Protozool. — 1981. — **20**, № 3. — С. 255—280.

Раилкин А. И. Квадрат числа пищевых вакуолей как новый показатель интенсивности фагоцитоза инфузорий-седиментаторов // Цитология. — 1982. — **24**, № 10. — С. 1241—1244.

Хайдар Муна. Таксономическое разнообразие и закономерности функционирования свободноживущих инфузорий в искусственных водоемах (на примере Комсомольского озера) : Автореф. дис. ... канд. биол. наук.. — Кишинев, 1992. — 24 с.

Хлебович Т. В. Количественные показатели питания инфузорий // Общие основы изучения водных экосистем. — Л. : Наука, 1979. — С. 100—106.

Хлебович Т. В. Общие закономерности скоростей питания и дыхания планктонных инфузорий // Тр. Пятого съезда ВГБО. — Куйбышев, 1986. — Т. 1. — С. 175—176.

Шубернецкий И. В., Кривенцова Т. Д. Количественные данные по питанию потребляющих бактерий инфузорий Vorticella convallaria и Carchesium polypinum // Гидробиол. исслед. водоемов Украины. — Киев, 1976. — С. 95—96.

Hoffman E. K., Rasmussen L., Zeuthen E. Cytochalasin B: aspects of phagocytosis in nutrient uptake in Tetrahymena // J. Cell. Sci. — 1974. — **15**. — P. 403—406.

Sher E. B., Sher B. F. Determination of phagotrophic protist feeding rates in situ. Protocols in Protozoology. — Lawrence : Allen Press, 1992. — B—13.1. — B—13.8.